云南植物研究 2007, 29 (1): 33～37
Acta Botanica Yunnanica

盾叶薯蓣花药培养及单倍体植株的获得*

闫立霞[1]，胡春根[2]，姚家玲[1]**

(1 华中农业大学生命科学技术学院，武汉 430070；2 华中农业大学园艺林学学院，武汉 430070)

摘要：以处于单核期的盾叶薯蓣花药为材料，经愈伤组织途径成功获得单倍体盾叶薯蓣新材料。对盾叶薯蓣花药培养、植株再生过程的研究表明：来自不同居群的外植体对花药愈伤组织诱导有显著影响；W14 是适合花药愈伤组织诱导的基本培养基；花药愈伤组织增殖和分化的适宜培养基为：MS 基本培养基 + BA2.0 mg/L + IAA0.2 mg/L；生根培养基为添加了IBA2.0 mg/L、NAA0.4 mg/L 和0.5 g/L 活性碳的 MS 培养基。以流式细胞仪和根尖染色体压片法检查花培植株的结果表明，有 8%～12% 的个体为单倍体。实验结果为进一步开展单倍体育种及相关理论研究提供了材料和技术基础。

关键词：盾叶薯蓣；花药培养；单倍体；植株再生

中图分类号：Q 945　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700 (2007) 01-033-05

Haploid Callus and Plantlets Regenerated from Anther Culture of *Dioscorea zingiberensis* (Dioscoreaceae)

YAN Li-Xia[1]，HU Chun-Gen[2]，YAO Jia-Ling[1]**

(1 *College of Life Science and Technology*，*Huazhong Agricultural University*，Wuhan 430070，China;
2 *College of Horticultural and Forest*，*Huazhong Agricultural University*，Wuhan 430070，China)

Abstract: Haploid plantlet and callus were induced from the anther culture of *Dioscorea zingiberensis* as the explant at the stag of later uninucleate period. The results indicates that the basal culture media and explants from different population affect dramatically callus induction from anthers. W14 was the best basal media for the first step of callus induction. MS media with BA2.0 mg/L + IAA0.2 mg/L improved callus′ multiplication and differentiation. MS media with 2.0 mg/L IBA, 0.4 mg/L NAA and 0.5 g/L active carbon were suitable for rooting. Examination of the anther cultured plantlet displayed that 8%-12% clones were haploid. The established technique system and obtained haploid plant would provide solid support and valuable materials for further breeding of *Dioscorea zingiberensis*.

Key words: *Dioscorea zingiberensis*；Anther culture；Haploid；Plant regeneration

盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis*) 别名黄姜、火头根，系薯蓣科多年生草质缠绕藤本，雌雄异株，其根状茎富含的薯蓣皂甙元是生产甾体激素类药物的重要原料 (丁志遵等，1983)。由于多年无计划采挖，野生资源严重破坏而濒临枯竭，现已转为人工栽培，在此过程中种质退化严重，皂甙提取成本提高、排污量增加 (金志雄等，2004)。生产中迫切需要通过各种育种技术获得薯蓣皂甙元含量高、产量高的品种。谢碧霞等 (1999)、任建伟等 (1994) 建立了盾叶薯蓣的组培快繁体系，李运合等 (2005)、周媛等 (2005) 通过离体诱导获得盾叶薯蓣四倍体植株，开展盾

---

* 基金项目：国家自然科学基金资助项目 (39770084)

** 通讯作者：Author for correspondence

收稿日期：2006-03-29，2006-12-15 接受发表

作者简介：闫立霞 (1980-) 女，华中农业大学生命科技学院硕士，研究方向为资源植物研究与利用。

叶薯蓣的多倍体育种。而花药培养获得的花粉植株经加倍后可迅速获得纯合植株，提高育种效率、缩短育种年限，在水稻、小麦等许多作物的单倍体育种中发挥了重要作用 (姜键等，2001；隋新霞等，2005)，因此尝试开展盾叶薯蓣的花药培养，期望得到单倍体或双单倍体植株，为解决盾叶薯蓣种质退化，培育高产和高薯蓣皂甙元含量的新品种奠定基础。

花药培养时诱导花粉植株能否成功及诱导频率受多种因素的影响，亲本植株的基因型、生理状态以及培养基组成、培养方式等对花粉植株的诱导频率有直接影响 (郭奕明等，2001；王伟光等，2005)。本文研究了不同居群的盾叶薯蓣花药、基本培养基等对其愈伤组织诱导及植株再生的影响，经染色体计数和流式细胞仪检测，确定了花培植株的倍性，首次通过盾叶薯蓣花药培养得到了单倍体植株，为进一步开展药用薯蓣的单倍体育种和相关理论研究提供了技术基础和实验材料。

1　材料与方法

1.1　材料

供试盾叶薯蓣取自湖北武当山、郧西县，河南南阳市，湖南泸溪县，种植在华中农业大学实验基地。

1.2　方法

1.2.1　花药愈伤组织的诱导　镜检确定花粉发育时期，选取花粉处于单核中晚期的花蕾，用 0.1%氯化汞溶液整体灭菌 10 min，无菌水冲洗 3～5 次，剥取花药，接种到 4 种诱导培养基上以筛选基本培养基 (表 1)。黑暗条件下 30℃预培养 3 d，后转入 28℃黑暗条件下诱导培养。在愈伤组织转移出来之前统计花药愈伤组织诱导率 (形成愈伤组织花药数 接种花药数×100%)。

1.2.2　植株再生　愈伤组织分化采用 2 步培养法：待愈伤组织长至 2～3 mm 时转入芽分化培养基 (表 2)，统计幼 (绿) 苗分化率 (分化幼苗数 转移愈伤组织数×100%)。分化培养的前三天采用散光照培养，后强光照培养。在愈伤组织分化出芽后将其转移至生根培养基中，生根培养基为 1/2MS 基本培养基，添加了 2.0 mg/L IBA、0.4 mg/L NAA、0.5 g/L 活性碳和 30 g/L 蔗糖。培养温度为 (25±3)℃。

表 1　愈伤组织诱导培养基

Table 1　Media for callus inducing from the anther

培养基代号 Medium code	基本培养基 Basal medium	添加的激素 Hormone composition
M	MS	2, 4-D 2.0 mg/L + KT2.0 mg/L + NAA0.5 mg/L
N	N6	2, 4-D 2.0 mg/L + KT2.0 mg/L + NAA0.5 mg/L
W	W14	2, 4-D 2.0 mg/L + KT2.0 mg/L + NAA0.5 mg/L
B	B5	2, 4-D 2.0 mg/L + KT2.0 mg/L + NAA0.5 mg/L

注：诱导培养基添加 0.7%琼脂，调节 pH 至 5.8，添加的糖类为麦芽糖　Note：All of the culture media were added with 0.7% agar，adjusting pH to 5.8，add maltose as sugar

表 2　分化培养基

Table 2　Culture media for differentiation

培养基代号 Medium code	培养基配方 Major components of the culture medium
F1	MS + BA2.0 mg/L + IAA0.2 mg/L + 蔗糖 3%
F2	MS + NAA1.0 mg/L + KT0.2 mg/L + 蔗糖 3%
F3	G 大量 + MS 微量 + MS 有机物 + BA2.0 mg/L + IAA0.2 mg/L + 蔗糖3 %

注：所有分化培养基添加 0.7% 琼脂，调节 pH 至 5.8　Note：All of the culture media were added with 0.7% agar，adjusting pH to 5.8

G 大量包含的成分：KNO_3　3 000 mg/L，$CaCl_2 \cdot H_2O$　220 mg/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$　440 mg/L　KH_2PO_4　500 mg/L

MS 大量包含的成分：NH_4NO_3　1 650 mg/L，KNO_3　1 900 mg/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$　370 mg/L　KH_2PO_4　170 mg/L

1.2.3　倍性鉴定　盾叶薯蓣花药培养再生植株的倍性鉴定，利用流式细胞仪 (德国 Partec 公司产品)，参照张俊娥 (2003) 的测定方法，分别检测对照和诱导材料幼嫩叶片和愈伤组织细胞中的 DNA 含量。根尖染色体计数：采用常规细胞染色体压片方法，卡宝品红染色。

2　结果与分析

2.1　培养基选择与不同居群外植体的差异

盾叶薯蓣花药接种后 2 周左右，在花药的表面形成愈伤组织。愈伤组织为白色或乳黄色，质地较密实，以花药两侧形成愈伤较常见 (图 1A)。接种 3 周后统计愈伤组织诱导率，结果见表 3。

实验结果显示，盾叶薯蓣花药培养的愈伤组织诱导率较低，居群和培养基对诱导率都存在显著影响，二者之间的互作效应显著。如来自河南南阳的材料在 W14 和 MS 基本培养基上形成了愈伤组织，诱导率分别为 5.2% 和 0.4%，在 N6 和 B5 培养基上则没有形成愈伤组织；来自湖南泸溪的材料在 N6 培养基上的诱导率最高，为 1.6%，在 W14 和 MS 培养基上诱导产生了花药愈伤，但在 B5 培养基上则不能形成愈伤组织。从培养基的主效应看，W14 培养基诱导率最佳；从居群效应看，河南南阳居群与湖南泸溪居群对于花药培养有较好反应。

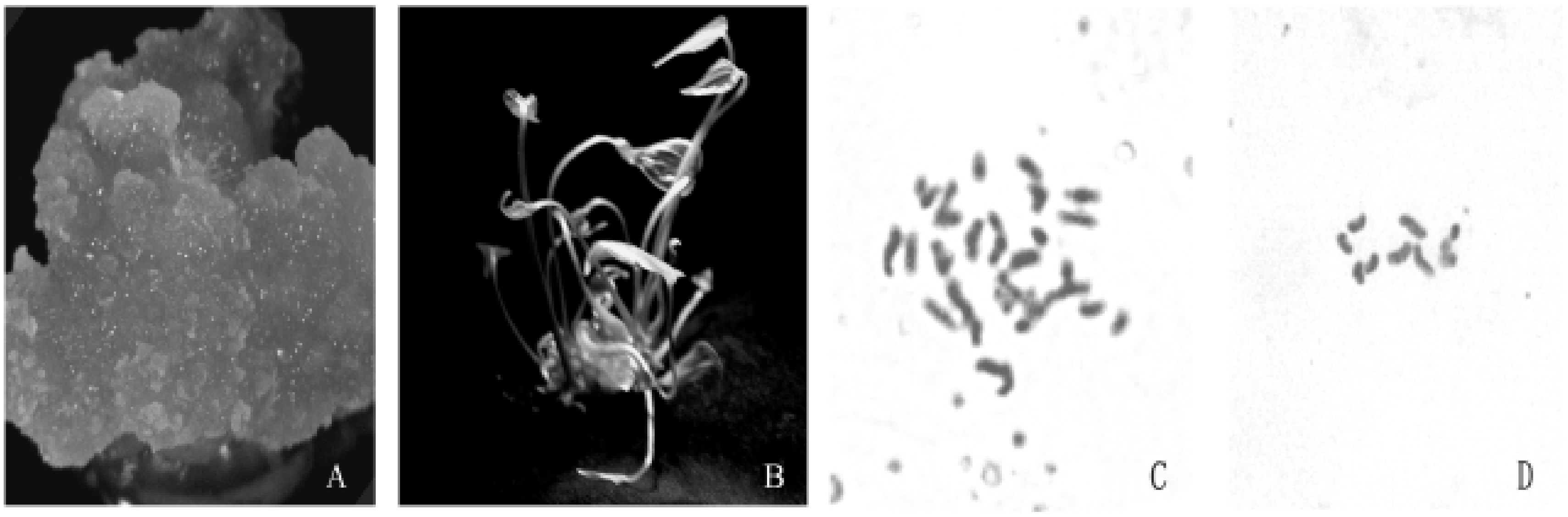

图1　A．盾叶薯蓣花药愈伤组织；B．盾叶薯蓣花药愈伤组织的再生植株；C．二倍体植株根尖染色体；D．单倍体植株根尖染色体

Fig．1　A．callus induced from the anther of *Dioscorea zingiberensis* C H Wright；B．plantlets regenerated from anther culture of *D. zingiberensis*；C．photo displayed the chromosomes of root tip cells from donor plant，2n = 20；D．chromosomes of the root tip cells of the regenerated haploid plantlet from anther culture，2n = 10

表3　不同居群盾叶薯蓣花药在各诱导培养基上的愈伤诱导效率

Table 3　Callus induce frequency in the media for anther culture from different populations of *Dioscorea zingiberensis*（%）

居群 Populations	培养基 Medium				居群平均（po）
	W14	N6	MS	B5	
湖北武当 Hubei Wudang	0.8±1.094	0	0	0.4±0.854	0.30 b
湖北郧西 Hubei Yunxi	1.6±2.118	0.4±0.894	0	0	0.50 b
河南南阳 Henan Nanyang	5.2±3.031	0	0.4±0.854	0	1.40 a
湖南泸溪 Hunan Luxi	1.2±1.788	1.6±1.672	0.4±0.855	0	0.80 ab
培养基平均（me）	2.20 a	0.50 b	0.20 b	0.10 b	

注：上述处理中，每处理5皿，每皿50个花药。以SAS 9.0对各居群与培养基的效果进行双因素方差及协方差分析。同一行或同一栏平均值后中含相同字母为差异不显著（LSD法，$p = 0.05$），LSDme0.05 = 0.7558，LSDpo0.05 = 0.7558

2.2　愈伤组织分化与植株再生（图1B）

生长素如2,4-D能够促进小孢子的分裂，诱导花粉粒发育成为愈伤组织，但要使愈伤组织分化成植株，则需要将其转移至含较低浓度生长素和较高浓度细胞分裂素的分化培养基上。为了比较生长素和细胞分裂素对植株分化的影响，本实验设计了含有高浓度BA和低浓度IAA的F1培养基和含有高浓度生长素的F2培养基。F3培养基的激素组合同F1，但基本培养基为G大量元素。G大量元素在我们已建立的盾叶薯蓣快速繁殖体系中，用于提高芽的增殖速率。

将愈伤组织转移进行分化培养时，常选取直径为1～3 mm的愈伤组织块。本实验中盾叶薯蓣花药愈伤组织在诱导培养基中生长30 d左右，其直径增殖达2～3 mm，此时将愈伤组织块直接转入分化培养基中，愈伤组织继续增殖，待生长3周时开始分化出绿芽，之后25 d左右继代一次，第一次继代时部分愈伤组织转绿，个别愈伤组织出现芽的分化；第二次继代时愈伤组织已全部出现芽的分化，易形成丛生芽，芽的数量从2-多个不等，有些已分化的芽在试管里伸长形成幼叶，将其转移至生根培养基后分化出根，形成再生植株。

盾叶薯蓣花药愈伤组织对3种分化培养基的反应不同，分化时间和分化率都有差异。统计不同分化培养基F1、F2和F3中的幼（绿）苗分化率，分别为50.0%、38.46%、20.0%。愈伤组织在F1培养基中分化最早，20 d左右出现多个绿芽，30 d左右长出幼叶形成幼苗；愈伤组织在F2培养基中芽分化的时间比F1晚3～4 d，芽数量少，幼叶发育不良，愈伤组织在F2培养基中可以同时分化形成根，但根细弱、易分支，移栽成活困难；愈伤组织在F3培养基中分化率最低(20%)，多数褐化死亡，而且芽开始分化所需要的时间更长，幼苗形成晚于F1培养基10～15 d。

实验结果表明，F1 是适合于愈伤组织分化的培养基，分析和比较这 3 种分化培养基的成分，其中 F1 和 F3 培养基具有相同激素和浓度，但 F3 培养基中缺少了 NH_4NO_3，表明 NH_4^+ 在盾叶薯蓣花药愈伤组织培养中有促进生长和分化的作用。而 F1 和 F2 的基本培养基相同，但添加的激素种类不同，添加BA2.0 mg/L、IAA0.2 mg/L的 F1 培养基比添加NAA1.0 mg/L、KT0.2 mg/L的 F2 培养基更适合于花药愈伤组织的增殖和分化。因此，适合盾叶薯蓣花药愈伤组织增殖和分化的培养基为：MS 基本培养基，添加BA2.0 mg/L、IAA0.2 mg/L。

2.3 再生植株的倍性鉴定

利用流式细胞仪检测盾叶薯蓣花药愈伤组织及再生植株的倍性，以二倍体植株的叶片为对照，测定了33 个花药培养的材料，其中 12 个是花药愈伤组织，21 个是再生植株的叶片，得到被测样品细胞的相对 C 值，采用 Partec DPAC 软件对检测细胞 DNA 含量分布图进行分析，测定结果显示花药培养材料的倍性水平比较复杂，所测的 33 个样品中，有单倍体峰、二倍体峰、四倍体峰和混倍体峰，具体比例见表 4。

表 4 盾叶薯蓣花培材料不同细胞倍性率

Table 4 The different ploid frequency of anther culture of *Dioscorea zingiberensis*

样品类型 Sample	单倍体 (1C) Haploid	二倍体 (2C) Diploid	四倍体 (4C) Tetraploid	混倍体 Mixoploid
愈伤组织 Callus (%)	16	67	8.3	8.3
再生植株 Plantlet (%)	9.5	81	5	5

图 2A 所示为对照盾叶薯蓣叶片 DNA 含量分布图，只有一个峰，说明对照为纯倍体，设定其细胞 C 值为 2C，图 2B 为花药愈伤组织再生植株叶片的 DNA 含量分布图，只有一个峰，也为纯倍体，但峰值约为图 2A 的1/2，说明其叶片细胞的 C 值为 1C，再生植株为单倍体。

对盾叶薯蓣花药培养再生植株还做了根尖染色体压片观察，共检测24 个单株，其中2 株根尖细胞染色体数目为2n = 10 (图 1D)，是单倍体植株。

本实验通过两种方法鉴定盾叶薯蓣花药愈伤组织及再生植株的倍性，分别检测到单倍体植株，但愈伤组织分化过程中会出现自然加倍的现象，使得再生植株单倍体检测率低于愈伤组织。

3 讨论

基本培养基的组成对花药培养成功率有明显影响。花药培养基种类很多，有些是适用于单子叶植物的，如朱至清为水稻花药培养设计的 N6 培养基，这种培养基已被广泛地应用于禾谷类作物的花药培养 (余叔文和汤章城，1992)；欧阳俊闻 (1991) 在进行小麦花药培养时，设计了 W14 培养基，大大提高了花粉植株的获得率。盾叶薯蓣虽然属于单子叶植物，但对适应于单子叶禾谷类花药培养的几个基本培养基的反应不同，从本实验对几种基本培养基的筛选结果来看，在禾本科植物花药培养中普遍适用的 N6 培养基，并不适合于盾叶薯蓣的花药培养，而 W14 培养基所得到的花药愈伤组织诱导率达到 5.2%，而且表现出对来自不同居群的花药有较广的适应性。

花培材料的遗传背景对培养成败关系甚大，如小麦在一步成苗中，不同的基因型表现很大的差异性 (任慧莉等，2002)；在棉花花药培养中，

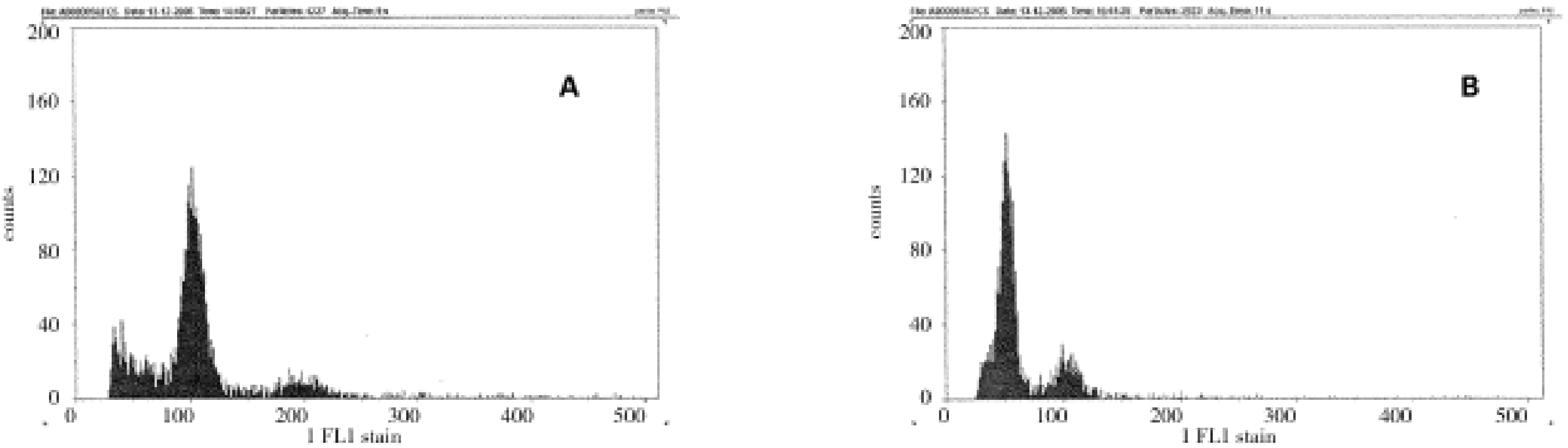

图 2 A. 盾叶薯蓣二倍体植株叶片 DNA 含量分布图；B. 花培植株叶片 DNA 含量分布图

Fig. 2 A. the distribution of relative DNA content in mesophyll of diploid control of *Dioscorea zingiberensis*；B. the distribution of relative DNA conent in mesophyll of regenerated plantlets from anther culture of *Dioscorea zingiberensis* C H Wright

不同基因型愈伤组织诱导之间有明显差异，而且对愈伤组织生活力也有影响（张宝红等，1994）；亚麻花药培养也存在基因型或居群对花药愈伤组织诱导力的差异（Bohus 等，2004）。我们在进行预备实验时曾选用了 28 个居群的材料，结果只有 8 个居群的花药在培养中对诱导有反应；本实验选用的 4 个居群的花药，在筛选出的最适基本培养基 W14 中的花药愈伤组织诱导率也有明显差异，因此在花药培养中对供试材料的筛选是非常重要的。

前人的研究表明，花培植株的倍性水平比较复杂，其中不但有单倍体、二倍体，还有多倍体、非整倍体和混倍体等，通常经愈伤组织途径分化形成的植株，出现非单倍体的频率较高（余叔文和汤章城，1992）。盾叶薯蓣花培植株经根尖细胞压片和流式细胞仪检测，发现有一定频率的单倍体植株（8%～12%），而二倍体植株占大多数(81.8%)。分析二倍体植株形成的原因，一是再生植株可能起源于花药壁组织的体细胞，二是来自花粉的单倍体愈伤组织在培养过程中染色体自然加倍(Assani 等，2003)。De Buyser 等（1980）曾分析，导致花培植株自然加倍的可能因素是核融合或者是愈伤阶段细胞核内有丝分裂。因此，在盾叶薯蓣的花药培养中可以追踪愈伤组织的确切来源和植株再生过程的形态发生，进一步优化花药培养的技术体系，提高单倍体或双单倍体再生植株的频率，以利于单倍体育种及相关理论研究。

本实验获得的盾叶薯蓣单倍体花粉植株，其形态表现和性别分化对于雌雄异株植物的性别发育理论学研究也是一个很有意义的材料，单倍体花粉植株及其加倍后的纯合二倍体植株的薯蓣皂甙元代谢方面的变化和在育种中的潜在价值有待进一步发掘。

〔参考文献〕

丁志遵，唐世容，秦慧贞，1983．甾体激素药源植物［M］．北京：科学出版社

余叔文，汤章城主编，1992．植物生理与分子生物学［M］．北京：科学出版社，20—23

欧阳俊闻，1991．小麦花药植株的诱导［A］．见：颜昌敬编，农作物的组织培养［M］．上海：上海科技出版社，205—222

Assani A，Bakry F，Kerbellec F *et al*．2003．Production of haploids from anther culture of banana (*Musa balbisiana* (BB))［J］．*Plant Cell Rep*，**21**：511—516

Bohus Obert，Beata Dedicova，Andrea Hricova *et al*．2004．Flax anther culture：effect of genotype，cold treatment and media［J］．*Plant Cell Tissue and Organ Culture*，**79**：233—238

De Buyser J，Henry Y，1980．Induction of haploid and diploid plants through in vitro anther culture of haploid wheat ($n=3x=21$)［J］．*Theor Appl Genet*，**57**：57—58

Duo XX（隋新霞），Fan QQ（樊庆琦），Li GY（李根英）*et al*．2005．Research advances in wheat anther culture［J］．*J Triticeae Crops*（麦类作物学报），**25**（4）：127—131

Guo YM（郭奕明），Yang YG（杨映根），Guo ZC（郭仲琛），2001．Current advances in anther culture and haploid breeding of maize［J］．*Chin Bull Bot*（植物学通报），**18**（1）：23—30

Jiang J（姜键），Jin CH（金成海），Hou CX（后春香）*et al*．2001．Research and application advances in rice anther culture［J］．*Chin Agric Sci Bull*（中国农学通报），**17**（4）：49—52

Jin ZX（金志雄），Wu WQ（吴文琴），Zhang Z（张珍），2004．The starch of dioscorea zingibernisis effects to α-amylase activity in bacillus subtilis［J］．*J Microbiol*（微生物学杂志），**24**（4）：23—24

Li YH（李运合），Hu CG（胡春根），Yao JL（姚家玲）*et al*．2005．Inducement of tetraploid *Dioscorea zingiberensis*［J］．*Chin Tradit Herb Drugs*（中草药），**36**（3）：434—438

Ren HL（任慧莉），Qin ZN（秦震霓），Li CL（李春莲）*et al*．2002．Effect of genotype and extrafactor on forming seedling through one-step culture in anther culture of wheat［J］．*J Northwest Sci Tech Univ Agric Forest*（Nat Sci Ed）（西北农林科技大学学报），**30**（4）：13—16

Ren JW（任建伟），Bai Y（白云），Guo QY（郭秋月）*et al*．1994．Preliminary Research on fixation of tetraploid *Dioscorea zingiberensis* cell suspension cultures［J］．*China J Chin Mat Med*（中国中药杂志），**19**（9）：529—573

Wang WG（王伟光），Gao YK（高亦珂），2005．Research advances in anther culture［J］．*J Inner Mongolia Univ Nat*（内蒙古大学学报），**20**（3）：280—284

Xie BX（谢碧霞），He YH（何业华），Yi ZJ（易志军），1999．Tissue culture and screening of high production clone line of *Dioscorea zingibernisis*［J］．*J Central South Forest Univ*（中南林学院学报），**19**（4）：17—21

Zhang BH（张宝红），Li XL（李秀兰），Li FL（李凤莲）*et al*．1994．Domina offect of genotype in cotton anther culture［J］．*Cotton Sci*（棉花学报），**6**：36—38

Zhang JE（张俊娥），Liu JH（刘继红），Deng XX（邓秀新），2003．Genetic variation of citrus calli revealed by the ploidy analyser［J］．*Acta Genet Sin Februar*（遗传学报），**30**（2）：169—174

Zhou Y（周媛），Hu CG（胡春根），Shi G（时光）*et al*．2005．Biological characters of tetraploid *Dioscorea zingiberensis*［J］．*J Wuhan Bot Res*（武汉植物学研究），**23**（4）：358—362